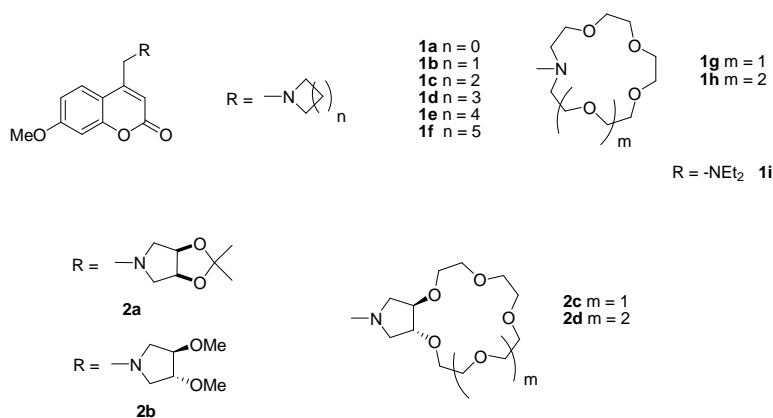


ZÁRÓJELENTÉS A 048739-ES SZÁMÚ, MOLEKULÁRIS SZENZOROK VIZSGÁLATA ÉS TERVEZÉSE CÍMŰ PÁLYÁZATHOZ

1. Metodikai fejlesztés

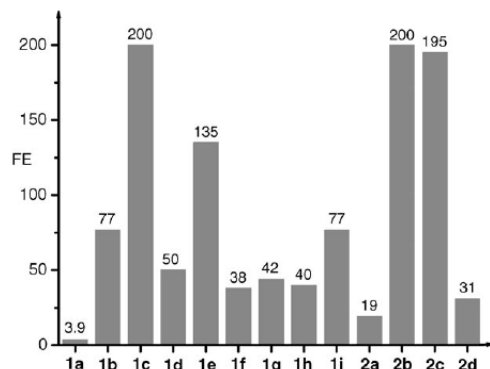
Munkánknak ezen része a jelátviteli folyamat jobb megértését, illetve ebből kifolyólag a szenzorok érzékenységének növelését célozta meg. Előállítottunk olyan N-metilén-kumarin szenzorokat, amelyekben a fluoreszcencia letöréséért felelős nitrogénatom különböző tagszámú gyűrűk részeként szerepelt. A protonálás hatására bekövetkező fluoreszcencia serkentések vizsgálata során arra az érdekes felismerésre jutottunk, hogy a PET folyamat hatékonysága jelentősen függ a nitrogénatomot tartalmazó gyűrű szerkezetétől. Ugyancsak vizsgáltuk a fluoreszcencia változását nyílt láncú, illetve koronaéter-származékok esetében is. Az eredmények rávilágítottak arra, hogy a serkentés mértéke akkor a legnagyobb, ha a kérdéses nitrogénatom egy öttagú (pirrolidin) gyűrű részeként szerepelt. Ezt követően vizsgáltuk, hogy a pirrolidin konformációs szabadsági fokainak változásai vajon hogyan befolyásolják a jelátviteli folyamat hatékonyságát. A pirrolidingyűrű mozgékonyosságának korlátozását egy acetonid egység bevitelével oldottuk meg. A protonálás hatására bekövetkező fluoreszcencia növekedés mértéke ebben az esetben a tized részére csökkent, azaz a jelátviteli folyamat hatékonysága nagymértékben függ a pirrolidingyűrű konformációs szabadságától. Dimetoxi-pirrolidint tartalmazó származékkal elvégzett kísérlet során igazoltuk, hogy a csökkent jelátvivő képesség nem a pirrolidinhez kapcsolt szubsztituensek hatására következett be. A fenti eredmények vezettek olyan kumarilmetil-pirrolidin szenzorok tervezéséhez és előállításához, ahol a pirrolidin egységhez receptorként funkcionáló 15-korona-5, illetve 18-korona-6 egységeket kapcsoltunk (1. Ábra).



1. Ábra. Vizsgált PET szenzorok

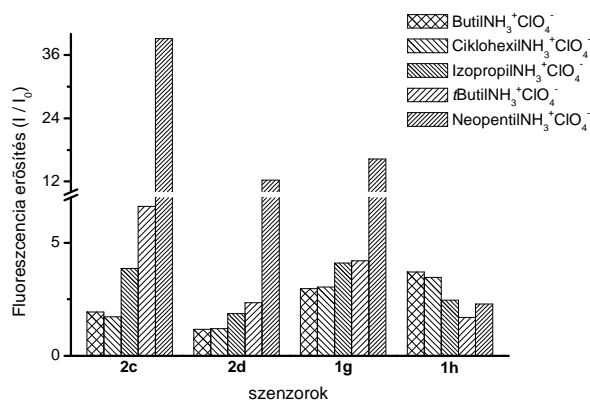
Ezeztől a szenzoroktól olyan működési mechanizmust reméltünk, amelynek során a koronaéterben a vendégmolekula bekötése által előidézett konformációs változások átadódnak a pirrolidingyűrűre, megváltoztatva ezzel annak a fluoreszcenciát letörő képességét, így előidézve a fluoreszcencia intenzitásának növekedését. Elsőként vizsgáltuk a két új szenzornak a protonálódás hatására bekövetkező fluoreszcencia serkentését. Megállapítottuk, hogy míg a kisebb méretű receptort tartalmazó vegyület esetében a jelátvivő képesség nem változott a korábban vizsgált, pirrolidint tartalmazó szenzor esetében tapasztalathoz képest, a nagyobb receptort hordozó jelzőmolekula esetében annak egyötöd részére csökkent (2. Ábra). Ez arra engedett következtetni, hogy a két, eltérő méretű koronaéter különböző térszerkezete következtében másképpen torzítja a pirrolidingyűrűt. Megvizsgáltuk a jelátadás hatékonyságát a két újfajta szenzor esetében, különböző térigényű ammóniumsók, mint vendégmolekulák jelenlétében. A feltételezett mechanizmusnak megfelelően azt reméltük, hogy a nagyobb

méretű ammóniumsók nagyobb mértékű torzulásokat idéznek elő mind a koronaéterben, mind a pirrolidin egységben. Megállapítottuk, hogy a két szenzor hasonlóan viselkedik az ammóniumsók jelenlétében, azzal a kivétellel, hogy a jobb jelzőképességgel rendelkező, kisebb receptort tartalmazó szenzor esetében sokkal nagyobb intenzitásváltozásokat tapasztaltunk.



2. Ábra. A vizsgált szenzorok protonálódásakor megfigyelhető fluoreszcencia-serkentések

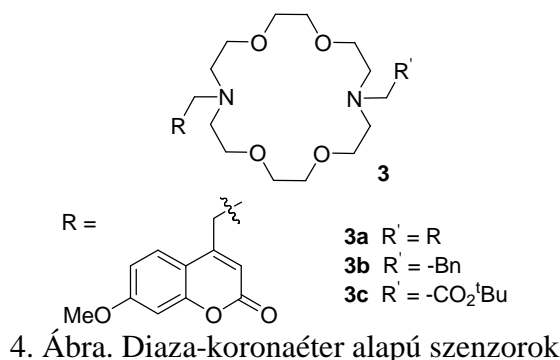
Várakozásainknak megfelelően az ammóniumsók növekvő térigényével nőtt a megfigyelhető fluoreszcencia-serkentések mértéke. A kísérleteket elvégeztük hagyományos szerkezetű, 18-as és 15-ös méretű aza-koronaéter szenzorokkal is. Az eredmények azt mutatták, hogy a kisebb méretű receptort tartalmazó azakorona szenzor esetében az ammóniumsók méretével nőtt a serkentés mértéke. Ezzel szemben az aza-18-korona-6 éter származéknál nem a sók mérete, hanem azok H-híd donor képessége (savassága) a meghatározó faktor (3. Ábra).



3. Ábra. A szenzorok fluoreszcencia-serkentése ammóniumsók jelenlétében

A vizsgálatokból arra következtettünk, hogy az elfogadott elmélettel szemben, amely szerint a vendégmolekuláknak a nitrogénatomhoz való direkt koordinációjának következtében változik a fluoreszcencia intenzitása, egy másik mechanizmus is felelős lehet a fluoreszcencia növekedéséért. Ez a másik mechanizmus a konformációs változások következménye. Valószínűsítjük, hogy a két mechanizmus együttesen felelős a tapasztalható fluoreszcencia serkentésért, a szenzor típusától függően különböző mértékben hozzájárulva ahhoz. Az előállított két újfajta szenzor esetében pl. a közvetlen koordinációból adódó hatások kizárhatók, itt tisztán a konformációs hatások érvényesülnek. A hagyományos szerkezetű, kisebb receptorméretű azakorona szenzornál a két mechanizmus együttesen fejti ki hatását, a konformációs mechanizmus túlsúlyával. A nagyobb receptorméretű azakorona származék esetében a koordinációs hatás érvényesül nagyobb mértékben.

A konformációs dinamika szerepének vizsgálatát kiegészítettük NMR spektroszkópai mérésekkel is. A vizsgált szenzorok sorát tovább bővítettük diaza-koronaéter származékokkal is (4. ábra).



- Az NMR spektroszkópai vizsgálatok négy fontos tényre engedtek következtetni.
1. A vizsgált komplexek minden esetben 1:1 szöchiometriájú komplexeket képeznek, amint ezt a Job-féle módszer eredményei mutatják.
 2. Az összehasonlításként szereplő monoaza-koronaéter, **1h** származék minden esetben 2-3 nagyságrenddel stabilabb komplexeket képez a vizsgált ammóniumsók (nButil-, neopentil-ammónium perklorát).
 3. A komplex stabilitási állandók egyenesen arányosak az ammóniumsók hidrogénhíd-donor tulajdonságával.
 4. A **2c** és **3a** összehasonlításában a kémiai eltolódás-változás ($\Delta\delta$) minden esetben nagyobb mértékű volt a **1h** komplexeknél.

	1h		2c		3a	
	logK	$\Delta\delta$ (ppm)	logK	$\Delta\delta$ (ppm)	logK	$\Delta\delta$ (ppm)
Butil-NH₃⁺	6,00	0,052	3,30	0,077	3,53	0,112
Neopentil-NH₃⁺	5,23	0,061	3,00	0,116	2,84	0,228

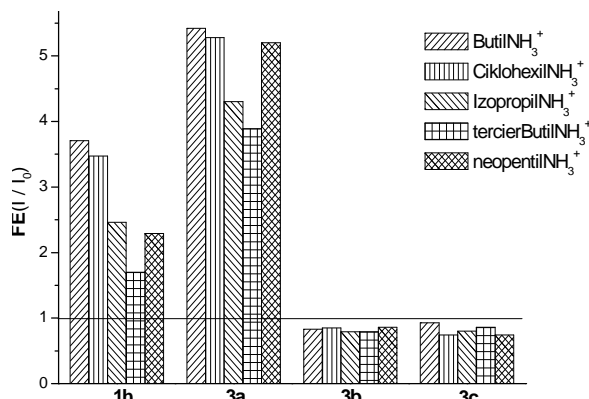
1. Táblázat. Komplex stabilitási állandók és $\Delta\delta$ értékek vendégmolekulák jelenlétében

Az eredmények alátámasztották korábbi eredményeinket amennyiben a konformációváltozásra érzékeny rendszerekben nagyobb mértékű torzulásokat figyelhettünk meg a komplexálódás során. A torzulás mértéke egyenesen arányos a vendégmolekula méretével. A vizsgált diaza-koronaszármazékok esetében tanulmányoztuk a fluoreszcencia-serkentéseket is vendégmolekulák jelenlétében. A **3a** szenzornál vizsgáltuk először a fluorofórok intra-, és intermolekuláris dimerizációjának lehetőségét (excimerképződés). Megállapítást nyert, hogy a fluorofórok kizárólag intermolekuláris dimereket képeznek mivel az excimerre jellemző sáv intenzitása koncentrációfüggést mutatott. Az excimerképzést kizárando a további kísérleteket 10⁻⁶ M koncentráció tartományban végeztük, ahol a dimerizálódás mértéke elhanyagolható. Összehasonlítottuk a **3a-c** szenzorok fluoreszcencia-serkentés értékeit ammóniumsók jelenlétében. Az **1h**, **3a** összehasonlításban azt tapasztaltuk, hogy mindkét szenzornál a vendégmolekulák H-donor tulajdonsága határozza meg a serkentés mértékét azzal a különbséggel, hogy a **3a**-nál minden esetben mintegy kétszerese volt ez a serkentés. Ez konformációs dinamika jelenlétével értelmeztük, mivel a szimmetrikusan szubsztituált származék esetében hangsúlyosabb a komplexálódás miatt a HOST szerkezetében bekövetkező konformációváltozás. Az **1h** szenzor esetében ugyanis a GUEST molekulák szabadon hozzáférhetnek a HOST receptoregységéhez, míg a **3a** esetben ez csak

úgy lehetséges, ha a komplexálódást megelőzi az egyik kumarinegység térbeli elmozdulása. A vizsgálati eredmények alátámasztják, hogy a **3a** esetében nagyobb mértékű a szerkezetbeli torzulás, mint az **1h** rendszernél ($\Delta\delta$ értékek). A **3a**-nál megfigyelhető fluoreszcencia serkentés így két komponensből tevődik össze:

- a nitrogénatomhoz történő direkt koordináció (**1h**-nál kizárólagos)
- az ellenoldali nitrogén környezete mozgásszabadságának megváltozása

Így a **3a** szenzorban mindkét fluorofór bekapcsol, különböző mértékben. Külön ki kell hangsúlyozni, hogy a **3a** esetben a kumulatív hatás eredményeként nagyobb fluoreszcencia serkentéseket figyelhetünk meg annak ellenére, hogy nagyságrendekkel gyengébben képes az ammóniumsók koordinálására, mint az **1h**.



5. Ábra. Diaza-koronaéter szenzorok fluoreszcencia serkentése ammóniumsók jelenlétében

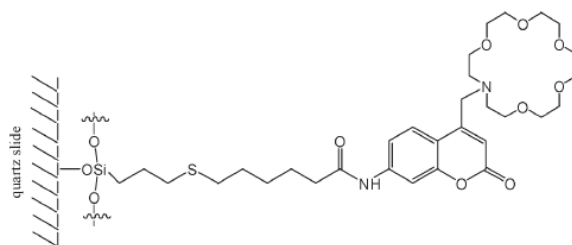
A **3b**, **3c** fluoreszcenciás vizsgálatai igen érdekes jelenségre világítottak rá. Ezen két szenzornál ugyanis, bár a fluorofórhoz képest ellenoldali szubsztituensek térigénye indokolná, nem figyeltünk meg nagyobb fluoreszcencia serkentési értékeket. Ezzel ellentétben minden esetben kismértékben ugyan, de csökkent a fluoreszcencia intenzitása. A jelenséget azzal magyaráztuk, hogy ezekben az esetekben a direkt koordináció a kumarilmetil-csoporttal szemköti nitrogénhez történik, azok nagyobb bázicitása következményeként. Ezt NMR mérésekkel igazoltuk is. Valószínűsítjük, hogy az ellenoldali koordináció a kumarilmetil-nitrogén körül olyan változásokat indukál ami még hatékonyabb fluoreszcencia kioltást eredményez.

Az e témakörben elért eredményeink alapján megállapítást nyert, hogy a hagyományos, kizárólag a vendégmolekulák H-donor képességén alapuló elmélettel szemben egy másik mechanizmus is fluoreszcencia változást idézhet elő PET szenzorokban. Ez pedig a komplexálódás következtében kialakuló szerkezetbeli változások eredménye. A két hatás egymásra épülve alakítja ki a megfigyelhető fluoreszcencia változást. A pályázatban vállaltakhoz képest annyi változás történt, hogy a szenzor jelátviteli folyamatának megértését célzó kísérleteket kibővítettük, mivel érdekes problémába ütköztünk. Emiatt az a receptor méretének és szerkezetének saxitoxinra való optimalizálását célzó kísérletek nem kerültek sorra. Véleményünk szerint azonban ez a tervmódosítás mindenképpen eredményesnek tekinthető, hiszen a kísérletek egy fontos problémát tisztáztak.

2. Szenzorfejlesztés

Munkánk ezen részében olyan módszert kívántunk kidolgozni, amely lehetővé teszi kiválasztott szenzorvegyületek szilárd hordozóra (kvarc, optikai szál) való kovalens rögzítését ezáltal olyan szenzort eredményezve amely alkalmas a célokban leírt toxin (saxitoxin) kimutatására. A módszer kidolgozásához monoaza-18-korona-6 éter alapú szenzort

választottunk, mivel ezen vegyület toxinfelismerő képessége már leírt az irodalomban. A szenzorvegyület kovalens rögzítését tioéter kötés kialakításával kívántuk elérni. Ehhez előállítottuk a szenzor bromoalkil-származékát, majd ezt reagáltattuk olyan kvarcüveggel amelynek felületét előzetesen tiol csoportokkal módosítottunk (6. Ábra). Spektrofotometriai és ellipszometriai jellemzések azt mutatják, hogy így módon a felület szenzor-borítottsága közel 80 % -os.



6. Ábra. Kvarcfelület kovalens módosítása szenzorvegyülettel

Az így módon előállított szenzor-prototípust teszteltük, vajon alkalmas-e a toxin kimutatására. A kísérletek eredményei arra engedtek következtetni, hogy már ezzel az egyszerű szenzorral is lehetővé válik a toxin kimutatása. A kimutatás érzékenysége pedig megközelítette a ma standardként használatos, ún. „egér bioassay”-t.

A kidolgozott eljárás tehát hatékornak nevezhető és a jövőben alkalmazható optikai szálak szenzorral való módosítására. Ezen kísérletek elvégzésére sajnos már nem jutott időnk. További feladat lenne a módszertani fejlesztés részben leírt „konformációs szenzorok” kiválasztása és optikai szálra való rögzítése.